

## 原著論文

## エストロゲンは骨格筋損傷の修復に良い影響を及ぼす

滝野 彩<sup>1)</sup> 廣瀬 立朗<sup>1)</sup> 桜井智野風<sup>1)</sup>

Aya Takino<sup>1</sup>, Tatsuro Hirose<sup>1</sup> and Tomonobu Sakurai<sup>1</sup> : Estrogen has a positive effect on repair of skeletal muscle injury

**Abstract :** Estrogen decrease has been associated with a number of negative outcomes, including a greater incidence of injury as well as a delay in recovery from these injuries. In recent year, our understanding of the protective effects of estrogen against various types of injury and disease states has grown immensely. Estrogen may affect muscle damage and inflammation, but the physiological significance of this, particularly potential effects on muscle repair and recovery in humans, and the mechanisms of its actions are as of yet unknown. Therefore, in this study, we observed the influence of estrogen on inflammation and repair process of skeletal muscle over time. Female wistar rats (14 weeks old : n=54) were divided into four groups : control (C, n=9), sham (Sham, n=9), ovariectomized (OVX, n=15) and ovariectomized + estrogen (OVX+E, n=16). After 10 days of estrogen exposure, Tibialis anterior muscle (TA) were muscle injured with a 0.5% Bupivacaine Hydrochloride (BPVC).

TA were removed 3, 5 and 7day post - injury and western blotting for Calpain3, heat shock protein (HSP70), activated (Pax7) and fusion (MyoD) satellite cells. Injury skeletal muscle showed elevated muscle calpain3 activity after muscle injury compared to intact muscle. HSP70 induction in skeletal muscle injuries was greater in C rats and OVX+E rats than OVX rats at the level of protein ( $P<0.05$ ,  $P<0.005$ ). Pax7 and MyoD expression served to define satellite cell activation and proliferation and were found to be up-regulated by estrogen ( $P<0.05$ ). These findings indicate that the gender-specific HSP70 and satellite cell response to skeletal muscle injury is mediated by the female-specific hormone estrogen. These findings suggest that the gender-specific HSP70 and satellite cell response to skeletal muscle injury is mediated by the female-specific hormone estrogen.

**Key words :** Estrogen, Skeletal muscle, HSP70, Satellite cell

**キーワード :** エストロゲン, 骨格筋, HSP70, 筋衛星細胞

1) 桐蔭横浜大学スポーツ科学研究科

*1. Graduate school of Sport Science, Toin University of Yokohama*

## I 緒 言

近年、女性のアスリートやスポーツ現場における活躍は目覚ましく、女性のスポーツへの関心が高まっている。2020年東京オリンピック、パラリンピックに向け、アスリートの効果的な育成における身体的かつ心理的な特性に着目した医、科学サポート等の支援モデルプログラムが推奨され、女性アスリートの国際競技力の向上が掲げられている。女性アスリートにおける身体的かつ生理的特性を考慮したトレーニングによるパフォーマンス向上の要因の1つとして、月経周期が関連していることが明らかになっている(相澤ほか, 2007; Nakamura et al, 2013; Petrofsky et al, 2015)。月経周期とは、卵胞ホルモンであるエストロゲンと黄体ホルモンであるプロゲステロンの周期的な変動により調節され(土肥ほか, 2015)、月経期、卵胞期、排卵期、黄体期の4期に分けられる(相澤ほか, 2007) (Fig. 1)。しかし、過剰な運動やトレーニングによるストレスは、初経発来の遅延や無月経などの月経周期異常や卵巣機能障害を促進することが報告されている(中村, 2011; Gomez et al, 1993; Shimizu et al, 2012)。エストロゲン低下は、疲労骨折や骨粗鬆症などの外傷の発生率の増加に関与している(Nattive et al, 2007; 能瀬ほか, 2014; Hewett et al, 2007; Park et al, 2009)。国立スポーツ科学センター (JISS) における国内トップレベルの女性アスリートを対象に実施したアンケート調査結果では、無月経を含む月経周期異常があるアスリートは約40%を占めることが明らかになっている(能瀬ほか, 2014)。また、10代におけるヤングアスリートの原発性無月経および続発性無月経が疲労骨折の発症率が高いことも報告されている(能瀬ほか, 2014)。特に、月経周期においてエストロゲンは心身に大きな影響を及ぼす。主に卵巣から産生されエストロン (Estrone)、エストラジオール (Estradiol)、エストリオール (Estriol) にわけられ、卵胞刺激ホルモン (Follicle stimulating hormone : FSH) によって産生される(高山ほか, 2008)。血中で最も生理活性の高いものはエストラジオールであり、その受容体であるエストロゲン受容体 (ER) と高い親和性をもっている(Park et al, 2009)。このエストロゲンは、女性の身体において多く分泌され、標的臓器である子宮、卵管、膣、骨代謝、自律神経などに影響を与える(川瀬, 2014)。また、性ホルモン(アンドロゲンやエストロゲン)は骨格筋においても産生、分泌し(Aizawa et al, 2007)、運動ストレスによって活性化することが報告されている(Aizawa et al, 2008; Aizawa et al, 2010)。

エストロゲンは、骨格筋や肝臓に作用することでインスリン抵抗性を軽減し、肥満や2型糖尿病などの発症を抑制する(Marthias et al, 2011)。骨格筋におけるインスリン刺激は、グルコースの取り込みを担うタンパク質であるグルコーストランスポーター (Glucose transporter 4 : GLUT4) を促進する(Carr et al, 2003; Lindheim et al, 1994)。このことから、エストロゲンはグルコースの取り込み作用、筋グリコーゲン利用の調節、脂質代謝の改善に作用する(Kumagai et al, 1993;

Naessen et al, 2001; Spangenburg et al, 2012)。動物モデルを用いた研究において、高脂肪食摂取 (HFD) ラットの骨格筋における糖の取り込みは、主にER $\alpha$ を介し、インスリン受容体のリン酸化やホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (Phosphoinositide3-kinase : PI3K) を介した経路を活性化し、Glut4のトランスロケーションを促進する(Barros et al, 2006)。高脂肪食による肥満やインスリン抵抗性は、長寿関連遺伝子 (Sirt1) によるミトコンドリア生合成の活性化や、脂肪酸酸化の強化を担うPeroxisome proliferator-activated receptor-g coactivator-1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) の脱アセチル化を介して改善する。また、C2C12筋細胞において、Sirtファミリーの脱アセチル化作用Sirt1依存性に対し、インスリン作用の負の調節因子であるprotein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) の発現を低下させることで、インスリン抵抗性を改善させることも知られている(Barros et al, 2006)。また、ER $\alpha$ の活性化において、速筋ではGLUT4を増加させるが、遅筋では増加させないことから、筋線維タイプによる影響があることも示されている(Gorres et al, 2011)。エストロゲンは、骨格筋の細胞膜を安定化させ活性酸素から細胞膜を保護する抗酸化作用を持つことが報告されている(Moosmann et al, 1999; Kendall et al, 2002)。

エストロゲンは、運動等による骨格筋の損傷において、マクロファージからの炎症性サイトカインの産生およびT細胞からのIFN- $\gamma$ およびIL17産生を抑制し、制御性T細胞を誘導することから、好中球やマクロファージの浸潤および過剰な活性の抑制作用がある(Stupka et al, 2001; Tiidus et al, 2001; Luo et al, 2011)。また、分子シャペロンである熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein 70 : HSP70)との関連も明らかになっている(Paroo et al, 2002; Stupka et al, 2000; Peter et al, 2003; Bombardier et al, 2009)。このHSP70は、熱ショック以外の虚血、アポトーシスなど様々なストレスにおいても発現する。HSP70は本来、ほぼ全ての生物で確認されるタンパク質で、平常時は分子シャペロンとして働いており、新生タンパク質の合成やストレスによって立体構造が崩れたタンパク質の補助 (フォールディング) を行う(Garrido et al, 2001; Schmitt et al, 2007)。動物モデルを用いた実験では、熱ストレスによってHSP誘導が骨格筋の虚血 - 再灌流によるミトコンドリア損傷を防いで細胞の壊死に対して有効であることが報告されており(Garramone et al, 1994; Lepore et al, 2000)、損傷抑制および修復に関与していると考えられる。また、筋衛星細胞 (satellite cell) における筋再生が注目されている。損傷などの刺激を受けると衛星細胞が活性化され、増殖、分化することで筋芽細胞 (myoblast) と呼ばれる前駆細胞になる。筋芽細胞は同様の機序を経て筋芽細胞と融合して、多核の筋管 (myotube) となり、成熟することで新たな筋線維を形成する(Hang et al, 2013)(Fig. 2)。マウスの筋芽細胞にエストロゲンを投与すると成長が促進し(Kahlert et al, 1997)、筋衛星細胞の筋原性活性化や増殖に影響を及ぼす(Deborah et al, 2008; Galluzzo et al, 2009; Velders, 2012)。

以上のように、エストロゲンは筋タンパク合成に関与するシグナル伝達系を活性化し、骨格筋の損傷および修復過程に関与することから、エストロゲンの欠乏は、発症リスクの増加や重症度に影響を与える可能性が考えられる。そこで本研究では、卵巢機能障害および無月経モデルを作成し、骨格筋の修復過程をエストロゲンとの関与が示唆されているタンパク質や、筋衛星細胞の活性化および分化、増殖過程を経時的に観察することによって、エストロゲンが骨格筋の損傷および修復過程に及ぼす影響を考察する。また、それにより女性のスポーツ活動および運動処方等に対する新たな知見を見出すことを目的とする。

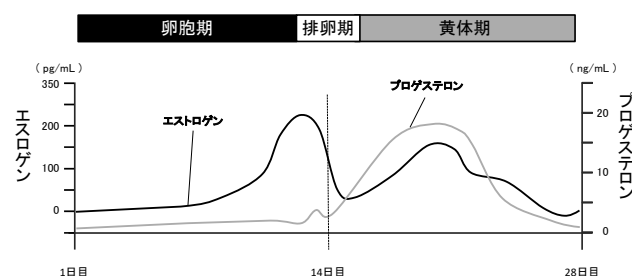


Figure 1. Woman Menstrual Cycle Phases

## II 方 法

### 1. 実験動物および飼育環境

すべての動物実験は桐蔭横浜大学動物倫理委員会規定に従って実施した。9週齢の雌性Wistarラット (n=54: 日本クレア) (体重: 170-210g) を購入し、成熟期の14週齢までの予備飼育を行った。コントロール群 (Control: C群) (n=9)、偽手術群 (Sham-operated: Sham群) (n=9)、卵巢摘出群 (Ovariectomized: OVX群) (n=15)、卵巢摘出のちにエストロゲン投与群 (Ovariectomized and Estrogen Administration: OVX+E群) (n=16) の計4群に設定した。

水および飼料は自由摂取とし、飼育環境は室温  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  に常時維持し、照明は12時間の明暗サイクルとした。

### 2. 偽手術および卵巢摘出手術

卵巢機能障害および無月経モデル作成において、加齢における骨格筋への筋萎縮等の影響を与えないように、成熟期にある14週齢の雌性Wistarラットを対象に手術を行った。

卵巢摘出 (OVX) 手術は、OVX群およびOVX+E群を対象とし、イソフルラン吸引麻酔 (マイラン製薬株式会社) 下で行った。側腹部を切開した後に、子宮および卵管を傷付けないように卵巢を取り出した。卵管を縫合糸で縫合し、腹腔内にもどした。その後、縫合糸および縫合器で皮膚を接合し、ゲージに戻し覚醒するまで経過観察を行った。偽手術 (Sham) 群においては、側腹部を切開した後に卵巢を確認後、皮膚を縫合糸および縫合器で皮膚を接合した。処理後、ゲージに戻し覚醒するまで経過観察を行った。

### 3. エストロゲン投与

卵巢摘出したOVX+E群のみを対象として行った。イソフルラン吸引麻酔下で、首もとの皮膚を約1センチ程度切開し、 $17\beta$ -Estradiol固形ペレット (0.25mg, Innovative research, 21days release) を埋込んだ。投与期間は10日間とし、屠殺時 (BPVC投与3, 5, 7日後) まで放出するように設定した。

### 4. 筋損傷作成

イソフルラン吸引麻酔下で、右足の前頸骨筋 (Tibialis anterior muscle: TA) に0.5%塩酸ブピバカイン (Bupivacaine hydrochloride: BPVC, 東京化学工業株式会社)  $500\mu\text{l}$  を5箇所に分け投与し、筋損傷を誘発した。BPVCは一般には局所麻酔剤マーカインといわれ、投与することによって筋衛星細胞および神経、血管細胞、基底膜以外の組織に影響を与えず、細胞を壊死することができる (Benoit and Belt, 1970; Nonaka et al, 1983; Saito and Nonaka, 1994)。

### 5. サンプル採取

採血は、OVX群およびOVX+E群のみ行った。イソフルラン吸引麻酔下で腹部を切開し、心臓穿刺によって採血し、直ちに遠心分離 ( $4^\circ\text{C}$ , 5000rpm, 15min), 血清のみを  $-80^\circ\text{C}$  にて凍結保存した。筋サンプルにおいては、損傷筋作成3, 5, 7日後のラットをそれぞれ麻酔下で失血死させたのち、両足の腓腹筋 (Gastrocnemius muscle: Gas), ヒラメ筋 (Soleus muscle: Sol), 長指伸筋 (Extensor digitorum longus muscle: EDL), 前脛骨筋 (TA) を採取した。採取した筋は筋湿重量測定後、直ちに液体窒素で冷却したイソペンタン内で急速凍結を行い、 $-80^\circ\text{C}$  にて凍結保存した。

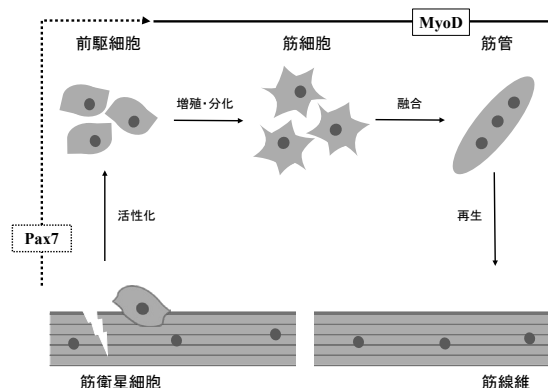


Figure 2. Mechanism of skeletal muscle regeneration

### 6. タンパク質調整

$50 \sim 100\mu\text{g}$  の筋サンプルに5倍量の Homogenization buffer (EDTA, HCL) を加え、ビーズ式破碎装置 (TOMY, Micro Smash MS-100) を用いて破碎し (5000rpm, 45秒間, 4セット), サンプル調整を行った (Sun et al, 2011)。タンパク質濃度の定量は、タンパク質濃度の検量線に分光光度計 (NANO DROP 2000c, Thermo) を用いて作成し、筋サンプルのタンパク質濃度を測定した。

## 7. SDS-PAGE

SDS-PAGEは原則としてLaemmli法に従って行った。7.5%ポリグリニド濃縮ゲルによって構成された厚さ1mmのスライドガラスを用いた。BIO RAD泳動槽を0.1 % SDSを含む10 × Tris-Glycine Bufferで満たし、ゲルには先行マーカーとして、0.1 % BPSを含む10 % Glycerol溶液をサンプルに注入してから180 volts/gelで約30分間泳動し、BPBのバンドが濃縮用ゲルから分離用に移動し、ゲル下端から5cmに移るまで泳動を続けた。

## 8. Western Blotting

SDS-PAGEで分離したゲルを、セミドライ式ブロッティング装置 (トランスブロットTurbo転写システム, BIO-RAD) を用いて、PVDFメンブレンにタンパク質を転写した。転写終了後、メンブレンを取り出し、スキムミルク5%を添付したTBS-T (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaCl, Tween20) で1時間ブロッティングした。1次抗体 (HSP70: R&D systems, AF1663 / Pax7: Bioss Antibodies, bs-2413R / MyoD: Bioss Antibodies, bs-2442R / Calpain3: Abbotec, 200193) は、5000倍希釈した抗体を室温で1時間浸漬し、TBS-Tでメンブレンを洗浄した。2次抗体 (HSP70およびPax7, Calpain3: R&D systems, HAF008 / MyoD: KPL Inc, 5220-0336) は、10000倍希釈を添加し、室温で1時間浸漬し、再びTBS-Tで洗浄した。シグナル検出は、HRP発光試薬 (MIXELL) をメンブレンに5分間浸漬した後、EG-Capture II (ATTO) で目的抗体シグナルを検出した。検出したバンドはパーソナルコンピューターに取り込み、画像分析ソフトを用いて、各サンプルのバンドと毎回スタンダードとして泳動したサンプルとの量比を算出した。

## 9. 統計解析

本実験における統計量は、平均値 ± 標準偏差 (SD) として示した。群間比較には、二元配置分散分析を行い、差が認められた際の検定にBonferroni法を用いた。なお、有意性は危険率を5 %未満で判定した。

## Ⅲ 結 果

### 1. 体重の変化

Fig. 3 に実験動物の体重の変化を表す。C群およびSham群、OVX群は経時的に増加傾向にある。特にOVX群においては、卵巣摘出後に有意に増加傾向を示した。卵巣摘出 (14週齢) 時において、Sham群と比較してOVX群およびOVX+E群が有意に高値を示した ( $P<0.05$ )。また、BPVC投与 (16週齢) 時および筋サンプル採取時において、OVX群と比較してC群およびSham群、OVX+E群が有意に低値を示した ( $P<0.05$ )。また、OVX+E群においてBPVC投与时に体重が低下する傾向があるが、エストロゲン投与によって卵巣摘出時の体重まで回復した。

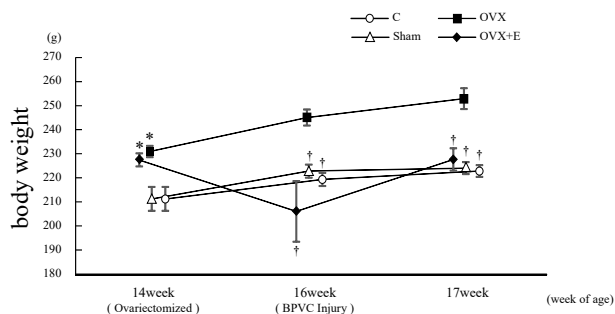


Figure 3. Body weight

### 2. 筋湿重量の変化

Fig. 4 に体重あたりの筋湿重量の変化を示す。損傷筋および非損傷筋において各群に有意な差はなかった。しかし、損傷筋と非損傷筋を比較すると、全群において損傷筋の方が低値を示す傾向があった。C群においては、BPVC投与3日後に有意な低値を示した ( $P<0.05$ )。OVX+E群は5, 7日後に有意な低値を示した ( $P<0.001$ ,  $P<0.05$ )。特に、OVX群においてBPVC投与3, 5, 7日後の全日数で有意に低値を示した ( $P<0.001$ ,  $P<0.05$ )。

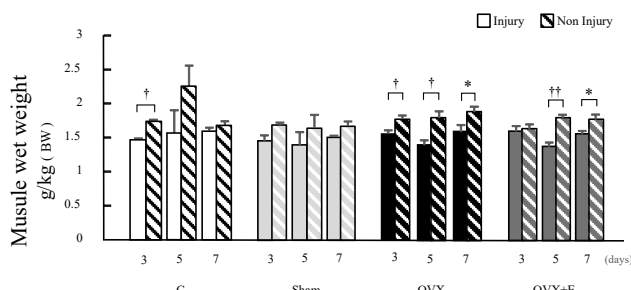


Figure 4. Muscle wet weight

### 3. タンパク質発現の変化

#### 1. Calpain 3

Calpain 3発現において各群に有意な差は見られなかったが、損傷筋と非損傷筋を比較して、損傷筋において発現が高まる傾向があった。

#### 2. HSP70

Fig. 5 にHSP70発現の変化を示す。BPVC投与3日後において、C群はOVX群およびOVX+E群と比較して有意に高かった ( $P<0.05$ ,  $P<0.05$ )。また、OVX群とOVX+E群を比較して、OVX+E群が有意に高値を示した ( $P<0.05$ )。BPVC投与7日後において、C群と比較して、OVX群およびOVX+E群の方が有意に高値を示した ( $P<0.05$ ,  $P<0.005$ )。また、OVX群と比較してOVX+E群の方が有意に低値を示した ( $P<0.05$ )。

OVX群において、BPVC投与7日後と比較して、BPVC投与5日後および7日後は、有意に高値を示した ( $P<0.05$ )。また、OVX+E群においてBPVC投与3日後と比較して、7日後は有意な低値を示した ( $P<0.05$ )。

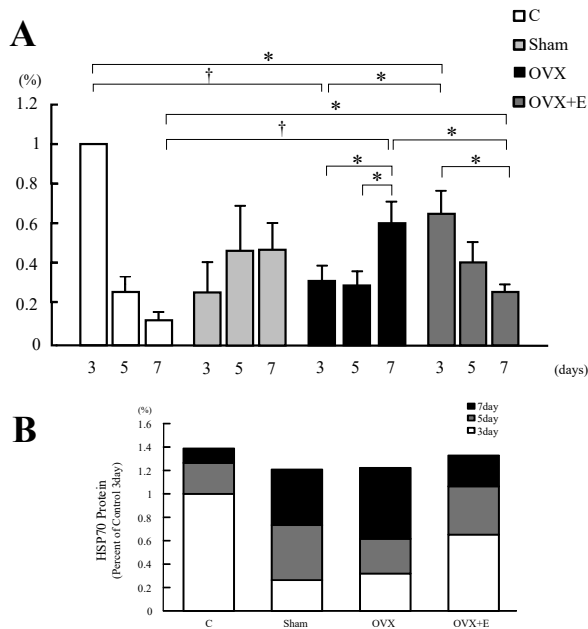


Figure 5. HSP70 protein

### 3. Pax7

Fig. 6 に Pax7 発現の変化を示す。BPVC 投与7日後において、C 群は OVX 群および OVX+E 群と比較して有意に高値を示した ( $P<0.05$ )。OVX+E 群において、BPVC 投与5日後と比較して7日後は有意に低値を示した ( $P<0.05$ )。また、OVX 群において全体的に発現が低くなる傾向があるが有意な差はなかった。

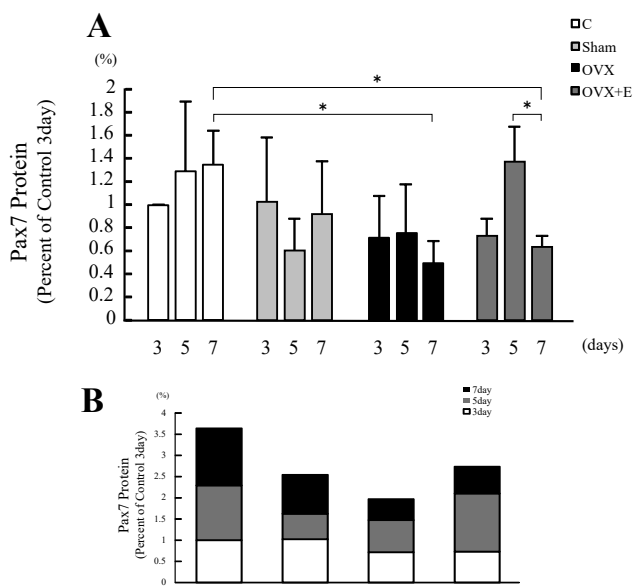


Figure 6. Pax7 protein

### 4. MyoD

Fig. 7 に MyoD1 発現の変化を示す。全体的に有意な差はみられなかったが、OVX+E 群において発現が高まる傾向があった。

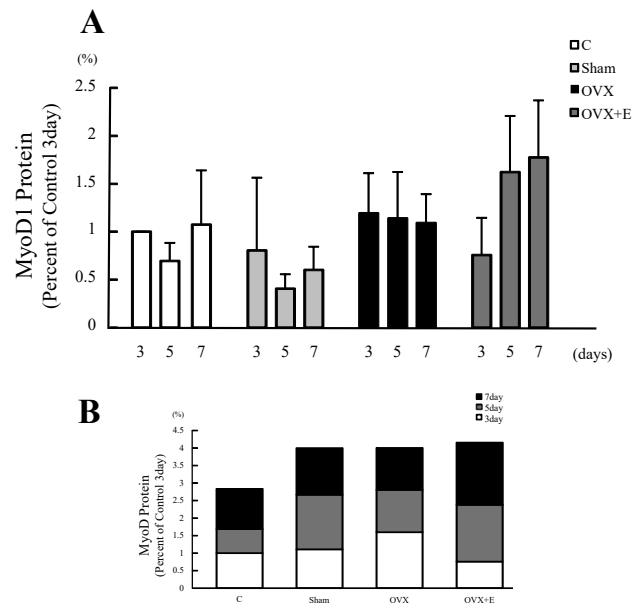


Figure 7. MyoD protein

## IV 考 察

エストロゲンは、骨形成増進や腸管における  $\text{Ca}^{2+}$  吸収を促進する働きにより血中  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を維持し(竹内ほか, 2002)、摂食行動の抑制やエネルギー消費の増加にも関わることが知られている(清水, 2002; Gao et al, 2008)。エストロゲンはレプチンと同様に、視床下部で STAT3 を介して食欲を抑制し、体脂肪量の低下や、エネルギー消費を上昇、脂肪細胞におけるリポ蛋白リパーゼの発現を抑制し、内臓肥満を抑制する働きもあることから体重の維持に関与している(Homma et al, 2000)。OVX 群における体重増加は、血中エストロゲン濃度の低下により、摂食行動が抑制されなくなったことや、活動量が減少したことによるエネルギー消費量が低下したことで、引き起こされたと考えられる。OVX+E 群における卵巣摘出直後のエストロゲン補給によって、血中エストロゲン濃度を一時的に増加し、急激なホルモンバランスの変動から体重減少に影響を及ぼした可能性が考えられる。体重が17週齢には手術時と同等量に回復したことは、ホルモン分泌状態が正常になったためと考えられる。また、体重あたりにおける筋湿重量の変化に、損傷筋および非損傷筋に影響を与えなかったことから、体重増加は脂肪量の変化によるものであると考えられる(Homma et al, 2000)。損傷筋における筋湿重量が、低値を示す傾向があることから、BPVC 投与による筋細胞の壊死が生じ、損傷筋線維にマクロファージが侵入し、貪食することによって(新藤ほか, 2004)、貪食細胞が分解、消化を受け筋線維断面積の減少および筋萎縮を起こしたことが考えられる(Robertson et al, 1993)。特に OVX 群は、卵巣摘出によるエストロゲン欠乏が損傷筋において顕著に現れていることから、萎縮を促進し、骨格筋量の維持に悪影響を与えたと考えられる(Sitnick et al, 2006; Tiidus et al, 2013)。

骨格筋損傷においてCalpain 3が関与していることが明らかになっている(Swapan et al, 2000; Robyn et al, 2006). Calpain 3は、 $\text{Ca}^{2+}$  依存的細胞内システインプロテアーゼファミリーに属する $\text{Na}^+$  /  $\text{Ca}^{2+}$  依存的なプロテアーゼであり、 $\text{Na}^+$  依存的に生理的  $\text{Ca}^{2+}$  濃度でも活性化される(Goll et al, 2003). 本研究における筋損傷作成は、BPVC投与により非損傷筋と比較して、損傷筋にCalpain 3発現が高値を示す傾向があることから、筋中の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を高めたことによって筋損傷を誘発されたことが考えられる(Benoit and Belt, 1970; Nonaka et al, 1983; Saito and Nonaka, 1994).

誘発した骨格筋の修復において、損傷および修復に関与するHSP70発現は、様々な生理的障害に応じて骨格筋に誘発され、細胞の損傷および機能不全に対する保護において重要な役割を果たす(Parsell et al, 1993; Morimoto, 1998). HSP70の発現は、骨格筋損傷3日後のOVX群はC群と比較して有意に低値を示すことや、C群およびOVX+E群において、骨格筋損傷3日後に発現が最も高くなる傾向がある。細胞の損傷直後における保護および修復作用にエストロゲンが関与していることが示された。これは、先行研究と同様の結果を示すことから(Paroo et al, 2002; Stupka et al, 2000; Peter et al, 2003; Bombardier et al, 2009), エストロゲンが関与していることが明らかとなった。HSP70発現は、Sham群において有意な差がなかった。腸管からのCa吸収量減少の抑制がsham群およびOVX群においてもCa吸収能の低下することから(麻見ほか, 1992), 本研究においても開腹による影響が考えられる。

Pax7における筋再生は、骨格筋の損傷および修復において重要な役割を担っており、運動等の刺激によって活性化され、増殖、分化の過程を経て骨格筋の修復や肥大を担っている(Albert et al, 2016). 近年、衛星細胞の自己複製(self-renewal)が注目されており、self-renewalの制御構造に関してPax7が深く関与している(Brack et al, 2014; Wen et al, 2012). また、動物モデルを用いた先行研究において、卵巣摘出ラットにおける運動誘発性損傷が、筋衛星細胞の活性化および増殖、分化を抑制させることが明らかとなっている(Deborah et al, 2008; KUANG et al, 2006). 本研究におけるPax7発現においては、C群と比較して、OVX群は有意に低値を示したことから、エストロゲンが筋衛星細胞の活性化を行うことが示唆された。筋衛星細胞の動態変化は、骨格筋損傷7日後に活性化することから初期段階であることが示唆された。OVX+E群において、損傷5日後と比較して7日後は有意に低値を示すことから、エストロゲン補給によって、筋衛星細胞の活性化が促進され短期間で筋衛星細胞の活性活動を終了したと考えられる。またPax7発現は、Sham群は全群と比較して有意な差がみられなかったことから開腹による影響が推測される。

MyoD筋再生において重要な役割を担う衛星細胞および転写因子であるMyoDファミリーは(MyD, myogenin, Myf5, MRF4)が、筋細胞系譜の決定、筋芽細胞の増殖、分化に関

与していることが知られている(Seale et al, 2001; Asakura et al, 2002). 動物モデルを用いた研究において、卵巣摘出ラットにおける運動誘発性筋損傷に対するエストロジオールの影響は、損傷筋の修復過程において再生を補助する衛星細胞の筋原性活性化や増殖に影響を及ぼすことが明らかになっているが(Deborah et al, 2008; Galuzzo et al, 2009), 本研究においてはMyoD発現に影響はなく、エストロゲンが筋の増殖や再生に影響を及ぼすという結果は得られなかった。しかし、OVX+E群において骨格筋損傷5, 7日後に上昇する傾向にあることから、エストロゲン補給によって筋の融合が促進され、筋再生が短期的になっている可能性が考えられる。またMyoD発現は、Sham群においては全体的に有意な差が見られないことから、Sham手術による開腹による可能性がある。

以上のことから、エストロゲン欠落は過食行動およびエネルギー消費量を低下させ、脂肪量を増加させることから肥満を促進させる。動物モデルを用いた先行研究から、卵巣摘出は体重増加および肥満を促進し、インスリン感受性を低下させることが明らかになっている(Mathias et al, 2011). また、インスリンは損傷の修復過程においても作用する。インスリン様成長因子I, II (IGF-I, II)は、損傷抑制およびマクロファージを分泌し、基底膜内の筋衛星細胞を刺激することで分裂、増殖を開始し、骨格筋の再生を行う(Robertson et al, 1993). エストロゲンは、マクロファージにおいても活性化することから、骨格筋損傷に対する保護作用などのシグナル伝達に影響を及ぼすことで、修復過程における筋衛星細胞の活動に影響を及ぼしたと考える。

## V ま と め

本研究では、エストロゲンが骨格筋の炎症および修復過程に及ぼす影響を経時的に観察した。筋再生の過程におけるエストロゲンの効果を調査するために、コントロール(C)ラット、偽手術(Sham)ラット、卵巣摘出(OVX)ラットならびに卵巣摘出およびエストロゲン投与(OVX+E)ラットの骨格筋(前頸骨筋: TA)を塩酸プビパカイン(BPVC)で損傷させた。損傷骨格筋は、無傷の筋と比較して筋損傷後に筋中カルパイン3(CAPN3)活性が上昇傾向を示した。損傷した骨格筋におけるHSP70発現は、OVXラットよりCラットおよびOVX+Eラットで高かった( $P<0.005$ ,  $P<0.05$ )。Pax7およびMyoD発現は衛星細胞の活性化および増殖を定義するのに役立ち、エストロゲンによって増加することが明らかになった( $P<0.05$ )。これらの知見は、骨格筋損傷に対するHSP70および筋衛星細胞の応答が女性特異的ホルモンのエストロゲンによって媒介することが考えられる。

本研究より、身体の発達が未成熟のヤングアスリートにおける卵巣機能障害は、エストロゲン分泌を低下させることによって、外傷リスクを高め、損傷後の治癒過程を遅延することが明らかになった。このことは、女性アスリートのスポーツ活動における月経周期の重要性を再認識するとともに、卵巣機能

障害における初期段階からのホルモン補充療法 (Hormone replacement therapy : HRT) を行うことで外傷を軽減することができる。これらの結果は、一般女性をはじめ更年期および高齢期の女性を対象としたスポーツ活動においても、運動指導やプログラム作成に有用な資料となる可能性を示唆している。

## 文 献

- Aizawa, K., Iemitsu, M., Maeda, S., Jesmin, S., Otsuki, T., Mowa, C.N., Miyauchi, T., Mesaki, N.(2007) Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292 : 577-584.
- 相澤勝冶, 中村有紀, 目崎登(2007) 女性アスリートの心身におけるコンディショニング 月経周期とアスレティックパフォーマンス. *臨床スポーツ医学*, 24 : 987-993.
- Aizawa, K., Iemitsu, M., Otsuki, T., Maeda, S., Miyauchi, T., Mesaki, N. (2008) Sex differences in steroidogenesis in skeletal muscle following a single bout of exercise in rats. *J Appl Physiol* 104 : 67-74.
- Aizawa, K., Iemitsu, M., Maeda, S., Otsuki, T., Sato, K., Ushida, T., Mesaki, N., Akimoto, T.(2010) Acute exercise activates local bioactive androgen metabolism in skeletal muscle. *Steroids* 75 : 219-223.
- Albert E. Almada and Amy J. Wagers(2016) Molecular circuitry of stem cell fate in skeletal muscle regeneration, ageing, and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, May 17(5): 267-279.
- Asakura, A., Seale, P., Girgis-Gabardo, A., Rudnicki, M.A.(2002) Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159 (1) : 123-134.
- 麻見直美, 森川尚美, 星名綾, 五十嵐千恵, 江澤郁(1992) 子卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの骨代謝に対する自由運動の効果. *日本栄養 食糧学会誌*, 45:423-427.
- Barros, R.P., Machado, U.F., Gustafsson, J.A.(2006) Estrogen receptors : new players in diabetes mellitus. *TRENDS Molecular Medicine* 12 : 425-431.
- Benoit, P.W., Belt, W.D. (1970) Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic bupivacaine. *J Anat*, 107 : 547-556.
- Bombardier, E., Vigna, C., Iqbal, S., Tiidus, P.M., and Tupling AR (2009) Effects of ovarian sex hormones and downhill running on fiber-type-specific HSP70 expression in rat soleus. *J Appl Physiol* 106: 2009-2015.
- Brack, A.S.(2014) Brack, A. S. Pax7 is back. *Skelet Muscle*, 4 (1) : 24.
- Carr, M.C. (2003) The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(6) : 2404-2411.
- Deborah, L., Enns and Peter, M., Tiidus(2008) Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J Appl Physiol* 104 : 347-353.
- 土肥美智子(2015) 総合医のためのスポーツ医学ベーシックス 総合医が知っておきたいスポーツ医学の知識 女性とスポーツ. 総合診療, 25 : 145-147.
- Galluzzo, P., Rastelli, C., Bulzomi, P., Acconcia, F., Pallottini, V., Marino, M.(2009) 17 $\beta$ -Estradiol regulates the first steps of skeletal muscle cell differentiation via ER-  $\alpha$  -mediated signals. *Am J Physiol Cell Physiol* 297 : C1249-C126.
- Gao, Q., Horvath, T.L. (2008) Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294 : E817-E826.
- Garramone, R.R. Jr., Winters, R.M., Das, D.K., Deckers, P.J.(1994) Reduction of skeletal muscle injury through stress conditioning using the heat-shock response. *Plast Reconstr Surg* 93 : 1242-1247.
- Garrido, C., Gurbuxani, S., Ravagnan, L., Kroemer, G.(2001) Heat shock proteins : endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 286 : 433-442.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003) The calpain system. *Physiol* 83 : 731-801.
- Gomez, E., Ortiz, V., Saint-Martin, B.(1993) Hormonal regulation of the secretory IgA (sIgA) system : estradiol and progesterone-induced changes in sIgA in parotid saliva along the menstrual cycle. *Am J Reprod Immunol*, 29 (4) : 219-223.
- Gorres, B.K., Bomhoff, G.L., Morris, J.K., Geiger, P.C. (2011) In vivo stimulation of oestrogen receptor alpha increases insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake. *The Journal of physiology*, 589 : 2041-2054.
- Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J.C.(2002) Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346 : 340-352.
- Hewett, T.E., Zazulak, B.T., Myer, G.D.( 2007) Effects of the menstrual cycle on anterior cruciate ligament injury risk : a systematic review. *Am J Sports Med* 35 : 659-668.
- Homma, H., Kurachi, H., Nishio, Y., Takeda, T., Yamamoto, T., Adachi, K., Morishige, K., Ohmichi, M., Matsuzawa, Y., Murata, Y. (2000) Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene, existence of a unique estrogen response element on the LPL promoter. *J Biol Chem* 275(15) : 11404-11411.
- Kahlert, S., Grohé, C., Karas, R.H., Löbbert, K., Neyses, L., Vetter, H.(1997) Effects of Estrogen on Skeletal Myoblast Growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 232, 2, 17 : 373-378.
- 川瀬良美(2014) 女性の生涯発達における月経周期の発達過程. 淑徳大学研究紀要, 48:61-79.
- Kendall, B., Eston, R.(2002) Exercise-Induced Muscle Damage and the Potential Protective Role of Estrogen. *Sports Med* 32 : 103-123.
- Kuang, S., Charge, S. B, Seale, P., Huh, M., Rudnicki, M. A. (2006) Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol*, 172 : 103-113.
- Kumagai, S., Holmang, A., Bjorntorp, P.(1993) The effects of oestrogen and progesterone on insulin sensitivity in female rats. *Acta physiologica Scandinavica*, 149(1) : 91-97.
- Lepper, C., Partridge, T.A., Fan, C.M.(2011) An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* 138 : 3639-3646.
- Lepore, D.A., Hurley, J.V., Stewart, A.G., Morrison, W.A., Anderson, R.L. (2000) Prior heat stress improves survival of ischemic-reperfused skeletal muscle in vivo. *Muscle*

- Nerve 23 : 1847-1855.
- Ling, L. S., Wan, J. L., Hai, T. W., Jie, C., Ping, D., Yue, W., and Jian, L. S. (2011) Protein Phosphatase Pph3 and Its Regulatory Subunit Psy2 Regulate Rad53 Dephosphorylation and Cell Morphogenesis during Recovery from DNA Damage in *Candida albicans*. *EUKARYOTIC CELL*, 2011 : 1565-1573.
- Lindheim, S. R., Buchanan, T. A., Duffy, D. M., Vijod, M. A., Kojima, T., Stanczyk, F. Z., Lobo, R. A. (1994) Comparison of estimates of insulin sensitivity in pre- and postmenopausal women using the insulin tolerance test and the frequently sampled intravenous glucose tolerance test. *J Soc Gynecol Investig*, 1(2) : 150-154.
- Luo, C. Y., Wang, L., Sun, C., Li, D. J. (2011) Estrogen enhances the function of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells that suppress osteoclast differentiation and bone resorption *in vitro*. *Cell Mol Immunol* 8 : 50-58.
- Nakamura, M., Hayashi, K., Aizawa, K., Mesaki, N., Kono, I. (2013) Effects of regular aerobic exercise on post-exercise vagal reactivation in young female. *European Journal of Sport Science*, 13 : 674-680.
- Matthias, R. Meyer, Deborah, J. Clegg, Eric, R. Prossnitz, and Matthias, Barton (2011) Obesity, Insulin Resistance and Diabetes: Sex Differences and Role of Estrogen Receptors. *NIH Public Access Author Manuscript*, 203(1) : 259-269.
- Moosmann, B. and Behl, C. (1999) The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc Natl acad sci USA* 96 : 8867-8872.
- Morimoto, R. I. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response : cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12 : 3788 - 3796.
- Naessen, T., Rodriguez-Macias, K., Lithell, H. (2001) Serum lipid profile improved by ultra-low doses of 17 beta estradiol in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 86 : 2757-2762.
- 中村真理子 (2011) 女子アスリートのコンディショニング評価. *日本臨床スポーツ医学会誌*, 19 (2) : 199-202.
- Nattiv, A., Loucks, A. B., Manore, M. M., Sanborn, C. F., Sundgot-Borgen, J., Warren, M. P. (2007) American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand : The female athlete triad. *Med Sci Sports Exerc* 39 (10) : 1867-1882.
- Nonaka, I., Takagi, A., Ishiura, S., Nakase, H., Sugita, H. (1983) Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol* 60 : 167-174.
- 能瀬さやか, 土肥美智子 (2014) 女性トップアスリートにおける無月経と疲労骨折の検討. *日本臨床スポーツ 医学会誌*, 22 : 67-74, 122-127.
- Park, S. K., Stefanyshyn, D. J., Ramage, B., Hart, D. A., Ronsky, J. L. (2009) Alterations in knee joint laxity during the menstrual cycle in healthy women leads to increases in joint loads during selected athletic movements. *Am J Sports Med* 37 : 1169-1177.
- Paroo, Z, E. Dipchand, and E. G. Noble (2002) Estrogen attenuates postexercise HSP70 expression in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 282 : C245-C251.
- Parsell, D. A., Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance : degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27 : 437-496.
- Petrofsky, J., Lee, H. (2015) Greater Reduction of Balance as a Result of Increased Plantar Fascia Elasticity at Ovulation during the Menstrual Cycle. *Tohoku J Exp Med* 237: 219-226.
- Robertson, T. A., Maley, M. A., Grounds, M. D., Papadimitriou, J. M. (1993) The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis. *Exp Cell Res*, 207 : 321-331
- Robyn, M. Murphy, Esther Verburg and Graham D. Lamb (2006) Ca<sup>2+</sup> activation of diffusible and bound pools of  $\mu$ -calpain in rat skeletal muscle. *J Physiol* 576 (2) : 595-612.
- Saito, Y., Nonaka, I. (1994) Initiation of satellite cell replication in bupivacaine-induced myonecrosis. *Acta Neuropathol* 88 : 252-257.
- 佐々木美憂, 江玉陸明, 奥山遼, 後藤聡介 (2018) 経周期における他動的膝関節屈曲時の膝蓋腱長の変化. *体力科学* 第67巻:199-204.
- Schmitt, E., Gehrman, M., Brunet, M., Multhoff, G., Garrido, C. (2007) Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 81 : 15-27.
- Seale, P., Asakura, A., Rudnicki, M. A. (2001) The potential of muscle stem cells. *Dev Cell* 1 (3) : 333-342.
- 清水弘行 (2002) 女性肥満の成因 特に性ホルモンと肥満の基礎的検討, *肥満研究* 8 (3) : 254-258.
- Shimizu, K., Suzuki, N., Nakamura, M., Aizawa, K., Imai, T., Suzuki, S., Eda, N., Hanaoka, Y., Nakao, K., Suzuki, N., Mesaki, N., Kono, I., Akama, T. (2012) Mucosal immune function comparison between amenorrheic and eumenorrheic distance runners. *J Strength Con Res*, 26(5) : 1402-1406.
- 新藤恵一郎, 近藤国嗣, 里宇明元 (2004) 筋線維の増生と再生. *リハビリテーション医学*, 41:313-323.
- Sitnick, M., Foley, A. M., Brown, M., Spangenburg, E. E. (2006) Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. *J Appl Physiol* 100 : 286-293.
- Spangenburg, E. E., Geiger, P. C., Leinwand, L. A., Lowe, D. A. (2012) Regulation of physiological and metabolic function of muscle by female sex steroids. *Med Sci Sports Exerc* 44 : 1653-1662.
- Stupka, N, S. Lowther, K. Chorneyko, J. Bourgeois, C. Hogben, and M. A. Tarnopolsky (2000) Gender differences in muscle inflammation following eccentric exercise. *J Appl Physiol* 89 : 2325-2332.
- Stupka, N, and P. M. Tiidus (2001) Effects of ovariectomy and estrogen on ischemia-reperfusion injury in hindlimbs of female rats. *J Appl Physiol* 91 : 1828-1835.
- Swapan K. Ray, Denise D. Matzelle, Gloria G. Wilford, Edward L. Hogan, Naren L. Banik (2000) Increased Calpain Expression Is Associated with Apoptosis in Rat Spinal Cord Injury: Calpain Inhibitor Provides Neuroprotectio. *Neurochemical Research*, Volume 25 : 1191-1198.
- 高山賢一, 井上聡 (2001) ホルモンの病態異常と臨床検査. 52巻11号:1265-1269, 2008.
- 竹内靖博 (編): 骨粗鬆症のマネジメントのすべて ホルモンと臨床, 第48巻春季増刊号: 医学の世界社.
- Tiidus, P. M., Holden, D., Bombardier, E., Zajchowski, S., Enns, D.



- Belcastro A. (2001) Estrogen effect on post-exercise skeletal muscle neutrophil infiltration and calpain activity. *Can J Physiol. Pharmacol* 79 : 400-406.
- Tiidus, P.M. (2003) Influence of Estrogen on Skeletal Muscle Damage, Inflammation, and Repair. *Exerc. Sport Sci* 31 (1) : 40-44.
- Tiidus, P.M., Lowe ,D.A., Brown ,M.(2013) Estrogen replacement and skeletal muscle: mechanisms and population health. *J Appl Physiol* 115 : 569-578.
- Velders, M., Schleipen, B., Fritzemeier, K.H., Zierau, O., Diel, P. (2012) Selective estrogen receptor-  $\beta$  activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *The FASEB Journal* : 11-194779.
- Wen,Y., Bi, P., Liu, W., Asakura ,A., Keller, C., Kuang, S.(2012) Constitutive Notch activation upregulates Pax7 and promotes the self-renewal of skeletal muscle satellite cells. *Mol Cell Biol*, 32 : 2300-11.
- Yin,H., Price, F., Rudnicki, M.A.(2013) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 93 : 23-67.